

95101322.X

The present invention relates to self-specific peptide, peptide-MHC complex, T cell subgroups activated by the peptide and/or complex, as well as the use of these compound in diagnosing and treating diseases.



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95101322.X

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

C07K 14/00

[43]公开日 1995 年 12 月 6 日

[22]申请日 95.1.19

[30]优先权

[32]94.1.20 [33]DE[31]P4401629.8

[32]94.2.4 [33]DE[31]P4403522.5

[32]94.5.24 [33]DE[31]P4418091.8

[71]申请人 伯伦格·曼海姆有限公司

地址 联邦德国曼海姆-瓦尔德霍夫

[72]发明人 J·恩德尔 P·斯塔尔

W·阿尔博特 G-G·琼

D·J·辛德尔 E·曼尔

K·道马尔

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 杜京英

C07K 7/06 C07K 7/08

A61K 38/08 A61K 38/10

A61K 38/16 G01N 33/53

C12Q 1/00 C12Q 1/24

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 抗原特异性活化T淋巴细胞,其检测和用途

[57]摘要

本发明涉及自身反应性肽、肽-MHC 复合物、与其反应的 T 细胞亚群,以及这些化合物的诊断和治疗应用。

# 权 利 要 求 书

---

1. 包括下列氨基酸序列的肽或肽衍生物:

(a) 氨基酸序列(I)

G-M-A-A-L-P-R-L-I-A-F-T-S-E-H-S-H-F-S-L-K-K-G-A-A

(b) 氨基酸序列(II)

E-R-G-K-M-I-P-S-D-L-E-R-R-I-L-E-A-K-Q-K

(c) 下列氨基酸序列中的一种

I-L-I-K-C-D-E-R-G-K-M-I-P-S

L-G-I-G-T-D-S-V-I-L-I-K-C-D

L-A-F-L-Q-D-V-M-N-I-L-L-Q-Y

Y-D-L-S-Y-D-T-G-D-K-A-L-Q-C

V-S-Y-Q-P-L-G-D-K-V-N-F-F-R  
L-A-A-D-W-L-T-S-T-A-N-T-N-M  
L-L-Y-G-D-A-E-K-P-A-E-S-G-G  
V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A  
L-L-Q-Y-V-V-K-S-F-D-R-S-T-K  
F-T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y  
L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R-E-I-I-G  
N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P  
K-I-W-M-H-V-D-A-A-W-G-G-G-L  
W-G-G-G-L-L-M-S-R-K-H-K-W-K  
E-G-Y-E-M-V-F-D-G-K-P-Q-H-T  
R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G  
W-L-T-S-T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E  
T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E-I-A-P-V  
L-V-S-A-T-A-G-T-T-V-Y-G-A-F  
Y-I-P-P-S-L-R-T-L-E-D-N-E-E  
V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F

(d)长度为至少 6 个氨基酸的(a)、(b)或/和(c)中所示氨基酸序列的部分区域,或/和

(e)具有与(a)、(b)、(c)或/和(d)中所示氨基酸序列基本相当的、与 MHC 分子结合的特异性或/和亲合力的氨基酸序列。

2. 权利要求 1 的肽或肽衍生物,包括:

(a)氨基酸序列(I),

(b)氨基酸序列(II),

(c)氨基酸序列(I)或/和(II)的部分区域,或/和

(d)具有与(a)、(b)或/和(c)的氨基酸序列基本相当的、与 MHC 分子结合的特异性或/和亲合力的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 或 2 的肽或肽衍生物,其中其长度为至少 8 个氨基酸。

4. 权利要求 1—3 之一的肽或肽衍生物,其中其长度为至少 10 个氨基酸。

5. 权利要求 1—3 之一的肽或肽衍生物,其中其长度达 25 个氨基酸。

6. 权利要求 1—5 之一的肽或肽衍生物,其中它带有标记基团。

7. 肽模拟物,其中它与 MHC 分子结合的特异性或/和亲合力与权利要求 1—6 之一的肽或肽衍生物的基本相当。

8. 含有至少一种能与 *MHC* 分子或 *MHC* 分子的肽结合衍生物结合的、在权利要求 1—6 之一的肽或肽衍生物或权利要求 7 的肽模拟物的复合物。

9. 权利要求 8 的复合物, 其中它含有 *MHC II* 型分子或其肽结合衍生物。

10. 权利要求 9 的复合物, 其中 *MHC II* 型分子为 *DR1*、*DR2*、*DR3* 或 *DR4* 型。

11. 权利要求 10 的复合物, 其中 *MHC II* 型分子为 *DR B1 0101*、*DR B1 0301*、*DR B1 0401*、*DRB1 0402*、*DR B1 0404* 或 *DR B1 1601* 亚型。

12. 权利要求 11 的复合物, 其中 *MHC II* 型分子为 *DR B1 0101* 或 *DR B1 0401* 亚型。

13. 权利要求 8—12 之一的复合物, 其中它含有重组 *MHC* 分子或其肽结合衍生物。

14. 权利要求 13 的复合物, 其中它包括 *MHC* 分子的可溶性肽结合衍生物。

15. 权利要求 8—14 之一的复合物, 其中它带有标记基团。

16. 寡聚的肽—*MHC* 分子复合物, 它含有通过共价或非共价相互作用而连结的至少 2 个 *MHC* 分子或 *MHC* 分子衍生物。

17. 权利要求 16 的寡聚复合物, 其中它含有通过化学偶联试剂交联的肽—*MHC* 分子复合物。

18. 权利要求 16 的寡聚复合物,其中它含有有数个 MHC 结合区并被寡聚肽组分所交联的 MHC 分子或 MHC 分子衍生物。

19. 权利要求 16 的寡聚复合物,其中它含有被抗体交联的肽—MHC 分子复合物。

20. 权利要求 16—19 之一的寡聚复合物,其中它含有权利要求 9—14 之一所定义的 MHC 分子。

21. 权利要求 16—20 之一的寡聚复合物,其中它含有至少一种权利要求 1—6 之一的肽或肽衍生物或权利要求 7 的肽模拟物。

22. 药物组合物,其中它含有权利要求 1—6 之一的肽或肽衍生物、权利要求 7 的肽模拟物或/和权利要求 8—21 之一的复合物作为活性成分,必要时与一般药物添加剂结合。

23. 权利要求 22 的组合物,其中它另外包括辅助刺激组分。

24. 权利要求 23 的组合物,其中辅助刺激组分选自细胞因子或/和表面抗原 B7。

25. 权利要求 22—24 之一的药物组合物用于制备诊断影响免疫系统的疾病或疾病素质、或诊断肿瘤疾病或肿瘤疾病素质的试剂。

26. 权利要求 25 的用途,即用于制备诊断自身免疫疾病或自身免疫疾病素质的试剂。

27. 权利要求 25 或 26 的用途,即用于制备诊断糖尿病或糖尿病素质的试剂。

28. 测定特异性 T 细胞亚群的方法，其中将含 T 细胞的样品与权利要求 1—6 的肽或肽衍生物、权利要求 7 的肽模拟物或/和权利要求 8—21 的复合物接触，并测定样品中的 T 细胞与肽或复合物的反应。

29. 权利要求 28 的方法，其中使用荧光标记的肽或复合物通过 FACS 分析测定 T 细胞的反应。

30. 权利要求 28 或 29 的方法，其中 T 细胞与肽或复合物接触前或/和后，对预活化 T 细胞进行选择。

31. 权利要求 22—24 之一的药物组合物用于制备治疗或预防影响免疫系统的疾病的试剂。

32. 权利要求 31 的用途，它是用于制备治疗或预防自身免疫疾病的试剂。

33. 权利要求 31 或 32 的用途，它是用于制备治疗或预防糖尿病的试剂。

34. 权利要求 1—6 之一的肽或肽衍生物，权利要求 7 的肽模拟物或权利要求 8—21 之一的复合物用于制备抗原，特别是免疫原或耐受原。

35. 特异性 T 细胞亚群的分离方法，其中将含 T 细胞的样品与权利要求 1—6 之一的肽或肽衍生物、与权利要求 7 的肽模拟物或与权利要求 8—21 之一的复合物接触，从而鉴别与肽或复合物反应的 T 细胞，必要时将其与其它 T 细胞分离。



36. 权利要求 35 的方法,其中 T 细胞与肽或复合物接触前或/和后,对预活化 T 细胞进行选择。

37. 按权利要求 35 的方法分离的 T 细胞或其部分结构用于产生抗体。

38. 权利要求 37 的用途,其中将 T 细胞或其部分结构注射到作为 T 细胞的原供体的病人中。

39. 权利要求 38 的用途,其中再注射灭活的 T 细胞。

40. 权利要求 39 的用途,其中再注射的 T 细胞是能够分裂的 T 细胞。

41. 抗权利要求 1—6 之一的肽或肽衍生物,权利要求 7 的肽模拟物或权利要求 8—21 之一的复合物的抗体,其可以通过用此肽、肽衍生物、肽模拟物或复合物免疫,并分离免疫产生的抗体得到。

42. 抗权利要求 41 的抗体的抗个体基团型抗体,其可用抗肽、肽衍生物或肽模拟物或复合物的抗体免疫,并分离免疫产生的抗个体基团型抗体而得到。

43. 与权利要求 1—6 之一的肽或肽衍生物、与权利要求 7 的肽模拟物或与权利要求 8—15 之一或权利要求 21 的复合物反应的 T 细胞。

44. 权利要求 43 的 T 细胞,它来自 T 细胞系 6/7(DSM ACC 2172)或具有相当的 T 细胞受体结合特异性。

45. 权利要求 43 的 *T* 细胞, 它来自 *T* 细胞系 6/10 (DSM ACC 2173) 或具有相当的 *T* 细胞受体结合特异性。

# 说明书

---

## 抗原特异性活化 T 淋巴细胞,其检测和用途

本发明涉及引起自体免疫反应的肽、这些肽与主要组织相容性复合物(MHC)分子的复合物、与这些肽或/和肽和 MHC 的分子的复合物反应的 T 细胞亚群,以及这些化合物的诊断和治疗用途。

近年来在自体免疫疾病如风湿性关节炎和青年期糖尿病(IDDM)的发展过程的分子间相互作用关系的探索方面进展迅速,同时揭示了这种探索在这些疾病的早期诊断和病因治疗中的实际应用。

现在可以肯定,在这些疾病的发展中除遗传倾向外,环境因素也起作用。例如在 IDDM 中,在遗传危险因素方面,只有几个 MHC II 型抗原的等位基因与该疾病密切相关。因此,可能通过分析这些等位基因确定 IDDM 的高危人群(参见,如 Thomson 等, *Am. J. Hum. Genet.* 43(1988), 799—816, 或 Todd 等, *Nature* 329(1987), 599—604)。

在 IDDM 发展中涉及的环境因素可能是作为免疫原的外源性肽序列。关于这一点还讨论了病毒性抗原,其与内源性结构有部分同源性。在特别的情形下,特别是产后时期,通过食物吸收的抗原如

牛血清白蛋白可产生免疫反应,由于与内源性结构的同源性,此免疫反应可引发自身攻击过程。

胰岛  $\beta$  细胞被细胞毒性淋巴细胞逐步破坏在 *IDDM* 病程中是很典型的。此过程在出现葡萄糖代谢明显失调前很长时间就开始了。当出现可检测的糖尿病表现时,90%以上的  $\beta$  细胞已被破坏。因此,为了对感染者提供病因治疗,在高险人群中早期检测这些自身攻击 *T* 细胞就非常重要。

现已发现在自身免疫疾病中对内源性组织的破坏在开始进行得非常慢。在此过程的起始阶段,自身攻击 *T* 细胞可能仅识别一个或几个自身抗原。*Kaufman* 等(*Nature* 368(1993),69—72)和 *Tisch* 等(*Nature* 368(1993),72—78)在 *I* 型糖尿病的动物模型(*NOD* 鼠)方面的工作表明,在此鼠系中自发糖尿病的实例中,起始 *T* 细胞介导的自身免疫反应定向于谷氨酸脱羧酶。在此情形中,在 *NOD* 鼠中开始时只有谷氨酸脱羧酶(*GAD*)C 末端的 1—2 个表位被识别。在此时还不可能检测到葡萄糖代谢的变化(如上所述),但已可以检测到胰岛周炎(*perinsulitis*)。只是在该病的进展期,自身攻击性 *T* 细胞识别的 *GAD* 肽谱才扩大。糖尿病变得明显后,还可能检测到抗其它胰岛细胞抗原如 *peripherin*、热休克蛋白 *HSP* 65 和羧肽酶 *H* 的预活化 *T* 细胞。

有证据表明在人体中 *I* 型糖尿病发展的病因还与对 *GAD* 的免疫反应有关。例如,在 80% 以上的前驱糖尿病患者中可以检测到抗

GAD 自身抗体,但据认为这些自体抗体的病因学作用小。相反,认为在 I 型糖尿病中存在着 T 淋巴细胞逐步破坏胰岛  $\beta$  细胞的过程。这些定向于 GAD 的 T 淋巴细胞已被几个研究组检测到(Harrison 等, *J. Clin. Invest*, 89(1992), 1161; Honeyman 等, *J. Exp. Med.* 177(1993), 535)。这些研究组发现的自身抗体与由 GAD 67kd 分子的 208—404 氨基酸组成的肽片段反应。

EP—A—0519469 中公开了一些来自人 GAD 65kd 分子且能引起自身免疫反应的多肽。这些多肽的氨基酸序列为:

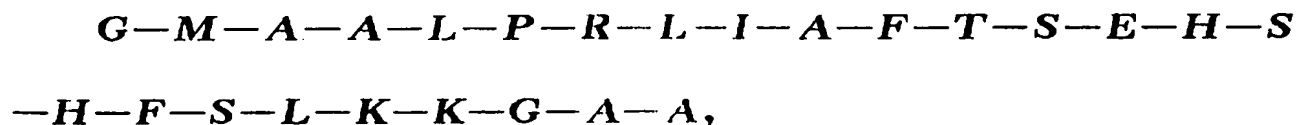


其中 X 代表由 1—10 个氨基酸组成的任选序列, Z 代表由 1—8 个氨基酸组成的任选序列。

本发明的目的是提供新的自身反应性肽,它与 I 型糖尿病人的 T 细胞反应,特别是与最近发现的 I 型糖尿病人的 T 细胞反应,并这样确定早期自身—表位。

本发明的目的是通过适合于对自身反应性 T 细胞进行检测、分离、增殖、无反应化或/和消除的肽、肽衍生物或可发生类似结合的分子来达到的。因此,本发明的主题为包括下列氨基酸序列的肽或肽衍生物:

(a) 氨基酸序列(I)



(b) 氨基酸序列(II)

E—R—G—K—M—I—P—S—D—L—E—R—R—I—L—E—  
A—K—Q—K,

(c) 图 1 或 2 所示的任何一种氨基酸序列,

(d) 至少 6 个氨基酸长度的在(a)、(b)或/和(c)所示氨基酸序列中存在的部分区域,或/和

(e) 具有与 MHC 分子结合的特异性或/和亲合力基本相当于(a)、(b)、(c)或/和(d)中所示的氨基酸序列的氨基酸序列。

本发明的肽或肽衍生物优选包括:

(a) 氨基酸序列(I),

(b) 氨基酸序列(II),

(c) 氨基酸序列(I)或/和(II)的部分区域,或/和

(d) 具有与(a)、(b)或/和(c)中氨基酸序列基本相当的,与 MHC 分子结合的特异性或/和亲和力的氨基酸序列。

本发明的肽或肽衍生物优选含有氨基酸序列(I)的部分区域:

L—P—R—L—I—A—F—T—S—E—H—S—H—F

或由此衍生的保留 N—末端 L—P 序列和 C—末端 H—F 序列的序列。

氨基酸序列(I)相当于人体 GAD 65 的氨基酸残基 266—290, 氨基酸序列(II)相当于人 GAD 65 的氨基酸序列 306—325。图 1 和 2 所示氨基酸序列也是人 GAD 65 的部分序列。

令人惊异地发现,相当于人 *GAD* 65 的氨基酸序列 266—285 和 306—325 的肽特异性地与从最近发现的 I 型糖尿病人中分离到的 T 细胞亚群反应。因此,本发明的肽为早期自身—表位,可用于 I 型糖尿病非常早期的诊断。另外,本发明的肽还可通过灭活与此肽反应的 T 细胞群而用于治疗。

与具有氨基酸序列(I)和(II)的本发明肽发生反应的 T 细胞亚群的优选实例为 T 细胞系 6/7 和 6/10,或具有相当的结合特异性的 T 细胞。T 细胞系 6/7 和 6/10 已按照 *Budapest* 条约的规定,以保藏号 *DSM ACC 2172*(6/7) 和 *DSM ACC 2173*(6/10),于 1994 年 5 月 10 日在“*Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*”(DSM) *Mascheroder Wey 1b, 38124 Braunschweig, Germany* 保藏。

氨基酸序列(I)和(II)为人谷氨酸脱羧酶(*GAD*)的 65kd 异构体的部分区域,其完整氨基酸序列已由 *Bu* 等描述(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(1992),2115ff)。氨基酸序列(I)和(II)是这样发现的:从 I 型糖尿病人外周血液建立 T 细胞系,然后用来自猪脑的 *GAD* 体外刺激,再用衍生自人 *GAD* 序列的合成肽序列在增殖试验中测试这些 T 细胞系。

本发明的肽可用熟知的合成方法用化学方法制得,或通过将编码这些肽的 *DNA* 序列在适合的宿主细胞中(特别是大肠杆菌)克隆和表达,用遗传工程方法制得。

另外,本发明还包括具有上述特别说明的氨基酸序列(I)或(II)或图1和2所示氨基酸序列的部分区域的肽,其长度至少为6个氨基酸,优选至少8个氨基酸,特别优选至少10个氨基酸,最优选至少15个氨基酸。

本发明肽的最小长度取决于其识别MHC分子、特异性地与其结合并与相应的T细胞受体反应的能力。

本发明肽中衍生自GAD并与MHC结合的区域最大长度优选为100个氨基酸,特别优选50个氨基酸,最优选25个氨基酸。

除具有氨基酸序列(I)和(II)或其部分区段的肽外,本发明还涉及包含有与上述序列基本相当的与MHC分子结合的特异性或/和亲合力的氨基酸序列的肽,其优选从氨基酸序列(I)或(II)或可发生类似结合的异源性物质中通过取代、缺失或插入个别氨基酸残基或氨基酸残基短片段衍生而来的肽。

本发明还特别涉及这样的肽变异体:其序列与上述氨基酸序列不完全相同,但有相同的或密切相关的“锚位”(anchor position)。此处的专有名词“锚位”指与MHC分子,特别是与DR3、DR4或DQ型的MHC分子结合所必需的氨基酸残基。例如Hemmer等,在Cell 74 (1993),197—203中给出了与DRB10401发生起动结合的“锚位”。在本发明的肽中这种“锚位”得到保留,或用任选具有化学上密切相关的侧链的氨基酸残基代替相应的氨基酸残基(如,缬氨酸代替丙氨酸、异亮氨酸代替亮氨酸,反之亦然)。



可用简单方法确定本发明肽中的锚位：即：检验上述特异肽的变异体与 *MHC* 分子结合的能力。本发明的肽，其特征在于它们具有与上述肽基本相当的、与 *MHC* 分子结合的特异性或/和亲合力。从具有氨基酸序列(I)或(II)的肽或从图 1 和 2 所示氨基酸序列衍生所得肽，优选与母肽或其部分序列具有至少 30% 的序列同源性，特别优选至少 50%，最优选至少有 60% 的同源性的肽。

这种已明确定义的肽的变异体的实例为来自人 *GAD 67* 的相应的同类肽片段，其完整氨基酸序列也已由 *Bu* 等，同上描述。

专用词“与 *MHC* 分子结合的基本相当的特异性或/和亲合力”还包括与氨基酸序列(I)、(II)或图 1 和 2 所示氨基酸序列相比更高的特异性或/和亲合力，这具体可在优选长度为 8—15 个氨基酸的肽片段的例子中见到。

另外，本发明还包括肽衍生物。此用语包括其中一个或几个氨基酸已通过化学反应衍生的肽。本发明所指的肽衍生物的例子具体为其中骨架或/和反应性氨基酸侧基如游离氨基、游离羧基或/和游离羟基被衍生的那些分子。氨基衍生物的具体例子为磺酸或羧酸酰胺、硫代氨基甲酸乙酯衍生物和铵盐如盐酸盐。羧基衍生物的例子为盐、酯和酰胺。羟基衍生物的例子为 *O*—酰基或 *O*—烷基衍生物。另外，本发明的肽衍生物还包括其中一个或几个氨基酸被 20 个“标准”氨基酸的天然或非天然氨基酸同系物所代替的那些肽。这种同系物的例子有 4—羟基脯氨酸、5—羟基赖氨酸、3—甲基组

氨酸、高丝氨酸、鸟氨酸、 $\beta$ -丙氨酸和 4-氨基丁酸。

特别优选这样的肽：它们具有与氨基酸序列(I)或(II)的肽基本相当的、与 MHC 分子结合的特异性或/和亲合力,但与后者相反,它们不会使 T 细胞活化,但却在 T 细胞中造成无反应性状态。

本发明还包括这样的多肽:其中与 MHC 结合的肽片段为更大多肽单元的组分,在这个大多肽单元中,与 MHC 结合的肽与多肽单元其余部分之间最好具有预定的断裂点,如蛋白酶裂解点。

本发明的另一个主题是那些带有能发出信号的物质或标记基团的肽或肽衍生物,标记基团,例如有荧光标记基团(如若丹明、藻红蛋白)、地高辛、生物素、放射性基团或毒性基团(如,蓖麻蛋白、霍乱毒素等)。本发明的肽与标记基团偶联使得肽能够用作体内或体外(如成像)的诊断试剂或用作治疗试剂。另外,本发明的肽还能以例如环化形式或寡聚形式存在,在这几种形式中,那些在与 MHC 分子结合中具有重要作用的序列被间隔区分离。

本发明还涉及那些与前述肽或肽衍生物具有基本相当的、与 MHC 分子结合的特异性或/和亲合力的肽模拟物。肽模拟物可以代替肽与 MHC 分子相互作用,并且与原肽相比,它们的代谢稳定性增加、生物利用度提高以及作用时间延长。肽模拟物的产生方法由 Giannis 和 Kolter 在“*Angew. Chem.*”、105(1993),1303—1326 中, Lee 等在 *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 66(1993), 2006—2010 中,及 Dorsch 等在“*Kontakte*”(Darmstadt)(1993)(2),48—56 中

作了描述。参考这些文献中公开的关于本发明肽模拟物的制备。

另外,本发明还涉及含有至少一种本发明的肽、肽衍生物或肽模拟物和至少一种 *MHC* 分子或 *MHC* 分子的肽结合衍生物的复合物。在此复合物中,肽、肽衍生物或肽模拟物与 *MHC* 分子或 *MHC* 分子的肽结合衍生物结合,结合常数优选为至少  $10^{-7} \text{ l/mol}$ , 特别优选为  $10^{-8} - 10^{-9} \text{ l/mol}$ 。另外,肽、肽衍生物或肽模拟物还可与 *MHC* 分子共价连结,例如通过光联剂或共价遗传肽—*MHC* 融合。这样的肽—*MHC* 融合蛋白 优选含有 *HLA-DR $\beta$*  链和遗传融合到其上的自身反应性肽的融合蛋白。该复合物特别优选含有 *MHC II* 型分子或其肽结合衍生物。

*MHC II* 型分子优选为 *DR* 型,例如 *DR1*、*DR2*、*DR3* 或 *DR4* 型。*MHC II* 型分子特别优选为 *DR B1 101*、*DR B1 0301*、*DR B1 0401*、*DR B1 0402*、*DR B1 0404* 或 *DR B1 1601* 亚型。最优选 *DR B1 0101* 或 *DR B1 0401* 亚型的 *MHC II* 型分子。*T* 细胞系 6/7 (*DSM ACC2172*) 在 *DR B1* 等位基团 0401 和 0101 或/和 1601 存在下,在含有氨基酸序列(I)的自身反应性肽的刺激下增殖。发现它在 *DR B1* 等位基团 0401 存在下,在含有氨基酸序列(II)的自身反应性肽的刺激下增殖。*T* 细胞系 6/10 (*DSM ACC2173*) 在 *DR B1* 等位基团 0401 存在下,在含有氨基酸序列(I)和(II)的自身反应性肽的刺激下增殖。

编码上述 *MHC II* 型分子的亚型的基团的核苷酸序列公开在

Corell 等(*Mol. Immunol.* 28(1991), 533—543)中。此处可参考这些文献。

“MHC 分子的肽结合衍生物”包括天然 MHC 分子通过蛋白水解裂解或通过重组 DNA 技术产生的 MHC 分子的片段,其基本保留了它们的肽结合特性。另外此用语还应理解为包括除与肽结合有关的 MHC 部分外还含有另外的多肽组分的融合蛋白。

本发明的肽—MHC 复合物优选通过无肽 MHC 分子或 MHC 分子衍生物与本发明的肽、肽衍生物或肽模拟物结合的方法而产生。无肽 MHC 分子可通过例如将天然 MHC 分子展开以解离结合肽,并将空的 MHC 分子再卷曲的办法而产生(见 Dornmair 和 McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(1990), 4134—4138 和 WO91/14701)。

另一方面无肽的 MHC 分子还可以通过 MHC 分子或其衍生物的重组生产而制得。这样的例子有 MHC II 型分子在成纤维细胞中表达(Germain 和 Malissan, *Ann. Rev. Immunol.* 4(1990), 281—315), 和无膜锚(anchor)的可溶性 MHC II 型分子衍生物在 CHO 细胞内表达(Wettstein 等 *J. Exp. Med.*, 174(1991), 219—228, Buelow 等, *Eur. J. Immunol.*, 23(1990), 69—76), 及通过在昆虫细胞内的杆状病毒表达系统表达 MHC II 类分子(Stern 和 Wiley, *Cell* 68(1992), 465—477; Scheirle 等, *J. Immunol.*, 149(1992), 1994—1999)。MHC I 型分子也在 CHO 细胞中

(Fahnestock 等, *Science* 258(1992), 1658—1662), 在昆虫细胞中 (Jackson 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(1992), 12117—12120; Matsamura 等, *J. Biol. Chem.* 267(1992), 23589—23595) 及在成纤维细胞中 (Mage 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(1992), 10658—10661) 表达。

另外, 还已知无肽 MHC 分子可以在大肠杆菌中表达 (Parker 等, *Mol. Immunol.* 29(1992), 391—378; Zhang 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(1992), 8403—8407; Garboczi 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(1992), 3429—3433; Altman 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(1993), 10330—10334)。本发明参考了这些出版物中描述的 MHC 分子或 MHC 分子衍生物的重组表达技术。

本发明复合物的 MHC 组分优选为重组 MHC 分子或其肽结合衍生物, 特别优选其中膜锚部分或完全缺失的可溶性 MHC 分子衍生物。

为了鉴别可以提呈本发明的自身反应性肽的 MHC 分子, 将供体的抗原提呈细胞与标记形式的本发明肽一起孵育, 最好先将天然 MHC 分子变性以解离结合肽。然后标记的 MHC—肽复合物可与亚型特异性抗体一起进行免疫沉淀, 后者是针对于 MHC 分子的构象组织特异性决定簇, 然后通过标记肽的存在鉴别此 MHC 分子。

另外, 供体的 EBV (Epstein—Barr Virus) 转化的 B 细胞可用

作抗原提呈细胞。

例如可以这样从重组 *MHC* 分子衍生物制备本发明复合物：通过 *PCR* 技术从供体经过 *EBV* 转化的 *B* 细胞系的 *CDNA* 之中分离 *MHC* 分子如 *MHC DR3*、*DR4* 或 *DQ* 分子的  $\alpha$  和  $\beta$  链的可溶部分的 *DAN* 片段，作为表达相应 *MHC* 分子的模板。在此步中，优选通过适当选择 *PCR* 引物，在  $\alpha$  和  $\beta$  链的 *C* 末端引入纯化辅助段，例如寡聚组氨酸片段（如六聚组氨酸片段）。然后，*PCR* 产物可亚克隆在大肠杆菌中，并表达为包涵体。可用已知方法将包涵体稳定化（参见，以上关于 *MHC* 分子在大肠杆菌中表达的参考文献）可用金属螯合亲和色谱法纯化 *MHC* 蛋白。然后， $\alpha$  和  $\beta$  亚单位在肽存在下复活。

如上所述，本发明的肽—*MHC* 复合物还可带有标记基团，在此情形下，标记基团可用已知方法与复合物中的肽组分以及 *MHC* 组分结合。

本发明的另一主题为寡聚的肽—*MHC* 复合物，其含有至少两个 *MHC* 分子或 *MHC* 分子衍生物，它们通过共价或非共价相互作用而连结。这种寡聚的肽—*MHC* 分子复合物与已知的单体复合物（对 *MHC* 分子而言）相比，一个优点是其亲合力高，因此诊断或/和治疗效力高。

在本发明的一种实施方案中，这种寡聚的复合物可按已知方法制备，单体肽—*MHC* 复合物通过化学偶联试剂共价交联，化学偶

联剂如从琥珀酰亚胺基—3—(2—吡啶硫基)丙酸酯、3—马来酰亚氨基苯甲酰基—*N*—羧基琥珀酰亚胺酯、马来酰亚氨基己酰基—*N*—羧基琥珀酰亚胺酯、二(马来酰亚氨基甲基)醚、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯、戊二醛等。任选地,也可能修饰肽组分或 *MHC* 组分的个别氨基酸使特异的偶联试剂优选进攻该位置。这样,蛋白组分用重组方法或肽组分用化学合成方法另外引入的半胱氨酸或赖氨酸就可以用 *SH* 联结剂或通过氨基进行偶联。

在本发明的另一实施方案中,可以这样制备寡聚的肽—*MHC* 复合物,使连结于 *MHC* 分子的肽组分作为寡聚体,即含有至少 2 个 *MHC* 连结区的肽分子,其中对连结 *MHC* 分子起重要作用的序列由间隔区相互分离。这些间隔区一般含 10—15 个氨基酸。使用小的亲水氨基酸如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、脯氨酸或其结合来构成这些间隔区。当无肽 *MHC* 分子在这些肽寡聚体存在下复活时,即形成了本发明的寡聚复合物,其所含 *MHC* 分子与寡聚肽组分通过非共价键作用交联。

另外,可通过修饰重组产生的 *MHC* 分子来制备寡聚的肽—*MHC* 复合物。在构建表达重组的 *MHC* II 型分子  $\alpha$  或  $\beta$  链的载体时,可能在一基因段上进行克隆,优选在 C—末端,该基因段编码被抗体识别的表位。此抗体可为 IgG 型,但优选为 IgM 型。然后复活的单体肽—*MHC* 复合物与能识别所引入表位的抗体一起孵育,以形成非共价交联的由几个抗体和几个肽 *MHC* 复合物组成的免

疫复合物。可用熟知的分子生物学技术,如插入限制性位点或定点突变,将编码表位的 DNA 段引入编码 MHC 分子  $\alpha$  或  $\beta$  链的 DNA 片段中。

本发明的寡聚的肽—MHC 复合物优选含有氨基酸序列(I)、(II)、图 1 和 2 所示的氨基酸序列、它的部分区域或/和从中衍生的氨基酸序列的肽,或其肽衍生物或肽模拟物。优选用寡聚复合物作为 I 型糖尿病的诊断或治疗试剂。

因此,本发明还涉及含有本发明肽、肽衍生物、肽模拟物或/和肽—MHC 复合物作为活性成分,必要时与一般药物添加剂结合的药物组合物。此组合物可以另外还有辅助刺激成分,如细胞因子,如 IL—2 和 IL—4 或/和表面抗原 B7( Wyss—Coray 等, *Eur. J. Immunol*, 23 (1993), 2175 — 2180; Freeman 等, *Science* 262 (1993), 909—911),它们能与 T 细胞表面分子 CD—28 结合。辅助刺激组分的存在可改进或/和调节组合物的治疗效果。

另外,本发明涉及含肽、肽衍生物、肽模拟物或/和肽—MHC 复合物的药物组合物在制备诊断试剂方面的用途,即用于诊断影响免疫系统的疾病或疾病素质(*predisposition*),或诊断肿瘤疾病或肿瘤疾病素质,特别是诊断自身免疫疾病或自身免疫疾病素质,如 I 型或 II 型糖尿病,优选 I 型糖尿病。

然而也可以用类似的方法应用于诊断其它自身免疫疾病。这种自身免疫疾病的例子有:多发性硬化,其中可以检测抗髓磷脂基质



蛋白或蛋白脂蛋白的活性 T 细胞；风湿性关节炎，其中可检测抗 II 型胶原、细胞角蛋白和 Hsp 65 的活性 T 细胞；Basedow 病，其中可检测抗甲状腺过氧化酶的活性 T 细胞。

一般来说，对影响免疫系统的所有疾病的诊断应用是可能的，如动脉硬化。在此情形下，已证明疾病与对热休克蛋白 Hsp 65 的免疫应答有关(Xu 等, *Lancet* 341, 8840(1993), 255—259)。

另一应用是与肿瘤抗原反应的 T 细胞的诊断检测。例如抗黑色素瘤相关抗原 MAGE1 的 T 细胞，它是从黑色素瘤病人中分离到的(Vander Bruggen 等, *Science* 254(1991), 1643—1647)。在用传统方法由于细胞量不足而检测不到肿瘤的阶段，本发明的寡聚复合物，可用于检测这些 T 细胞。另外，特异性反应的 T 细胞的检测还可用于监测抗肿瘤接种反应。

本发明因此还涉及检测特异性 T 细胞亚群的方法，其特征在于将含 T 细胞的样品，优选来自体液如全血的样品，与本发明的肽、肽衍生物、肽模拟物或/和本发明的复合物接触，即可检测 T 细胞与肽与复合物的反应。T 细胞与复合物或肽的特异性反应可通过例如 T 细胞增殖的增加来检测，后者可通过例如掺入的放射活性来测量。另一方面，还可利用标记肽或复合物直接测定与 T 细胞的反应。在此方案中，优选使用偶联有荧光标记的肽或复合物。例如可通过 FACS 分析进行评价，就是使 T 细胞先与偶联有 T 细胞特异性抗体的第一荧光标记物接触，然后与偶联有第二荧光标记物的

肽—MHC 复合物接触,通过荧光图谱分析检定双标记细胞。这样就测定出以那些 与本发明肽或肽衍生物或/和与本发明肽—MHC 复合物具有特征性反应活性的 T 细胞亚群。由于特异性 T 细胞群在血中浓度低,作为此方法的第一步,应该优选选择预活化的 T 细胞,如通过与 IL—2 孵育或/和与 IL—2 受体抗体孵育得到特定浓度的 IL—2 受体阳性 T 细胞,然后用例如免疫磁法分离抗体结合细胞。另外,可以在 T 细胞与肽或复合物接触后进行 预活化 T 细胞的选择。

在此方法的改进中,还可以测定预活化自身反应性 T 细胞(即有 IL—2 受体作为表面标记的 T 细胞)与非活化的自身反应性 T 细胞(即无 IL—2 受体的 T 细胞)的比例。

此方法可特别用于诊断 I 型糖尿病,还可用于诊断影响免疫系统的其它疾病,或用于诊断这些疾病的素质。

本发明另外涉及含本发明肽、肽衍生物、肽模拟物或/和肽—MHC 复合物的药物组合物在制备治疗或预防影响免疫疾病的试剂方面的用途。关于本发明的肽和本发明的肽—MHC 复合物的治疗用途,可以使用例如与毒素偶联的肽或肽—MHC 复合物来治疗疾病,另外还可以把肽单独使用或作为复合物的成分来治疗疾病,虽然它们与 T 细胞受体结合,但不引起 T 细胞活化,即具有无反应化作用。

这种无 反应化肽类似物的治疗作用是由于这样的事实: T 细

胞受体(TCR)必需与被 I 型或 II 型 MHC 抗原提呈的肽相互作用,才能活化 T 细胞。在此过程中,肽的锚位氨基酸 具体负责与 MHC 分子结合,而肽中的其它氨基酸的贡献是与 TCR 相互作用从而对 T 细胞产生刺激。因此有可能在肽中由于氨基酸的取代而产生肽类似物,由于存在锚位点,它们仍能与 MHC 份子结合,但仅产生部分 T 细胞活化或不活化(参见,如 Sloan—Lancaster 等, *Nature* 363(1993),156—159)。这样,肽类似物有例如使特异表面分子的表达达到更高水平(如 IL—2 受体, LFA—1)的作用,但不发生增殖或细胞因子的表达。与这样的肽类似物作用的 T 细胞被转化成所谓的无反应性状态,即即使接下来用免疫原性肽常规刺激后,它们也不再增殖。该无反应性状态持续至少 7 天,因此可用于治疗自身免疫疾病。

本发明的另一治疗应用是此肽或肽和 MHC 分子的复合物可用作抗原。在此情形下,这种抗原可作为免疫原,即刺激免疫反应的试剂,或作为耐受原(*tolerogen*),即产生免疫耐受的试剂。作为免疫原的应用,例如可用作对抗肿瘤抗原的接种。为此目的,此处不用整个肿瘤细胞,可能注射能被 T 细胞识别的肿瘤特异性肽与相应的 MHC 分子的复合物,特别是寡聚复合物,以引起抗肿瘤的 T 细胞反应。为了增加免疫刺激,还可能将此复合物与另外的刺激物质结合使用。例如细胞因子如 IL2 或 IL4 适合此目的,它可任选并优选与本发明的肽—MHC 复合物共价连结。另一种可能性是

此复合物与那些与激活 T 细胞有关的辅助组分结合以活化 T 细胞,特别是与抗原提呈细胞的上所必需的表面分子结合,如表面分子 B7。

优选的 治疗配方是将载有肽的 MHC 分子整合在人工载体中,如脂载体,此配方中还可任选含有膜结合分子如 B7 或/和固定化细胞因子。

本发明 另外涉及与本发明的肽或肽—MHC 复合物反应的 T 细胞亚群的分离。此方法是:将例如来自预先采来自病人的体液的含 T 细胞的样品,与本发明的肽或本发明的肽—MHC 复合物接触,这样就可鉴别与肽或复合物反应的 T 细胞,必要时将它们与其它 T 细胞分离。在此情形下,还可能在 T 细胞与肽或复合物接触前或/和后,选择预活化的 T 细胞,即带有 IL—2 受体的 T 细胞。

在此方法中,还可使用在载体上呈固定化形式存在的肽或肽—MHC 复合物,这就简化了阳性反应 T 细胞群与其它 T 细胞分离的方法。通过再刺激,可从用此方法分离的 T 细胞亚群中建立 T 细胞系。然后,这些自身反应性 T 细胞系可用于免疫病人。

I 型糖尿病的特异免疫治疗包括:首先分离抗自身抗原的特异性 T 细胞系自身抗原如 IDDM 病人的 GAD 65。然后确定 T 细胞系的最佳(*fine*)特异性,即鉴别自身反应性肽。选择那些识别优势肽的 T 细胞系用于随后接种病人,优势肽即数种分离到的 T 细胞系均可与之反应的肽。上述的 T 细胞系中特别要提到的是能识别

氨基酸序列(I)或(II)的肽的 T 细胞。

如果在病人中没有明确的优势肽,必须将数种 T 细胞系混合用于随后接种。在孵育前,所选择 T 细胞系再用抗原提呈细胞及用适当的肽刺激,以确保活化分子的良好表达,特别是 T 细胞受体的表达。然后将 T 细胞系灭活,例如通过热处理或/和放射活性照射,优选剂量为 4000—10000 拉德,特别优选 ca. 8000 拉德,并皮下注射到作为该细胞供体的病人的体内,细胞数量优选为  $10^7$  到  $5 \times 10^7$ 。一般持续 6—12 个月的时间内至少注射三次。

然后检测病人对接种物的 T 细胞反应。为此,例如用 *Ficoll* 密度梯度离心分离病人的外周血淋巴细胞(PBLs)并用标准增殖试验来测定由接种物引起的增殖。成功免疫后,作为对接种物的反应,应该能检测到病人的 PBLs 的大量增殖。对免疫成功的进一步控制是确定免疫过程中病人的 GAD—反应性 T 细胞的发生率。这例如可用标准有限稀释法进行,即用自体细胞与 GAD 共同孵育后再用 4000 拉德射线照射,以这种细胞作为刺激细胞。如果免疫进行得成功,自身反应性 T 细胞发生率明显减少。

被起调节作用的 T 细胞所识别的接种物 T 细胞的表面结构被进一步窄化后,还可能用起调节作用的 T 细胞的部分结构,如 T 细胞受体片段来免疫。

另外,在抗肿瘤免疫的情形下,可以再注射有分裂能力的 T 细胞,这可导致病人对肿瘤细胞的主动免疫。

在鉴别或活化/抑制特异性 T 细胞亚群的诊断和治疗方法中,还可以用能激活 MHC-肽复合物活性的抗个体基因型(*anti-idiotypic*)抗体代替本发明的肽或肽-MHC 分子。这种抗体易于得到,可用抗特异肽的特异性 T 细胞亚群作为免疫原以产生抗体(如在鼠中),或首先产生抗 MHC-肽复合物的第一种抗体,然后再产生抗第一种抗体的抗个体基因型抗体。

因此,本发明的另一主题是抗本发明肽或肽衍生物或抗本发明复合物的抗体(第一抗体),它可以通过用此肽、肽衍生物或复合物免疫,并分离免疫产生的抗体而得到,优选为 *Kohler* 和 *Milstein* 的方法或进一步改进的方法产生的单克隆抗体。

最后,本发明还涉及抗第一抗体的抗个体基因型抗体,第一抗体是抗本发明肽或肽衍生物或复合物的抗体,用第一抗体免疫并进行分离即得到由免疫产生的抗个体基因型抗体。

本发明的又一主题物是能与本发明的自身反应性肽、肽衍生物或肽模拟物或此肽与 MHC 分子的复合物反应的 T 细胞。T 细胞优选的实例是来自 T 细胞系 6/7(DSM ACC2172)或 6/10(DSM ACC2173)的 T 细胞,或具有基本相当的 T 细胞受体结合特异性的 T 细胞,即可识别 MHC 分子提呈的肽或具有氨基酸序列(I)或(II)或/和这些氨基酸序列部分区域的肽的 T 细胞。

下列实施例结合图 1—4,用于进一步阐明本发明。

图 1 表示本发明的自身反应性氨基酸序列

图 2 表示本发明的另一些自身反应性氨基酸序列

图 3 表示 T 细胞系 6/7 与肽库增殖试验的结果

图 4 表示 T 细胞系 6/10 与肽库增殖试验的结果

图 5 表示 T 细胞系 6/7 与来自肽库 7 和 11 的单一肽的增殖试验的结果

图 6 表示 T 细胞系 6/10 与来自肽库 7 和 11 的单一肽的增殖试验的结果。

## 实施例 1

### 建立 GAD 特异性 T 细胞系

#### 1. 初级刺激

用 *Ficoll* 密度梯度离心法从 I 型糖尿病人的 EDTA 抗凝血中分离外周血液淋巴细胞 (*PBLs*)。这些细胞用 *RPMI* 培养液洗涤两次,并悬浮在由 *RPMI* 1640、5% 人血清、2mM 谷氨酰胺和 100u/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素组成的培养基中。将相当于 100000 个细胞的 100μl 细胞悬浮液置于 96 孔圆底培养板的每个孔中。然后加入终浓度为 2.5μg/ml 的猪 GAD (*SW-GAD*)。在 37℃/7%  $\text{CO}_2$  孵箱中将细胞孵育 3—4 天。这段时间后,加入 100μl *IL-2* (30u/ml)。再过 3—4 天后,从所有培养混合物中每孔吸出 100μl,再加入 100μl *IL-2* (30u/ml)。每 3—4 天重复一次。

#### 2. 再刺激

初级刺激开始后第 14 天进行第一次再刺激。为此,用 *Ficoll*

方法分离初级刺激中的两倍数目的自体 *PBLs*，调节在培养基中的细胞浓度为  $2 \times 10^6 / \text{ml}$ 。这些刺激物细胞的一半与抗原 *SW-GAD* (终浓度  $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) 孵育 2 小时/ $37^\circ\text{C} / 7\% \text{CO}_2$  (抗原脉冲性刺激)。另一半在相同条件下不接触抗原，仅与培养基孵育。然后，所有刺激物细胞用 4000 拉德照射。再将刺激物细胞分布在 96 孔圆底板中 ( $100000$  个细胞/孔)，其排布方式使含抗原的刺激物细胞孔总与无抗原的刺激物细胞孔相邻。

然后从初级刺激制备物中制备 *T* 细胞。为此，从初级刺激制备物中吸出上清液，盘中的细胞用 *DMEM* 液洗两次，每次用  $100 \mu\text{l}$  (*Dulbeccos Modified Fagk Medium = DMEM*)。每次冲洗后细胞在盘中以  $400\text{g}$  离心沉淀。然后将每孔细胞悬浮在  $100 \mu\text{l}$  培养基中，将各  $50 \mu\text{l}$  细胞悬液分配在再刺激盘的两个相邻的孔中。以此方式，在一有抗原的孔中和相邻的无抗原的孔中孵育 *T* 细胞，这可以监视再刺激的抗原特异性。

再刺激开始后第 2 天或第 3 天，可以通过显微镜评估其增殖。在此过程中，只有那些反在有抗原的孔中发生增殖的微培养对被 视为有意义。从第 4 天，向每个培养孔中依次加入  $100 \mu\text{l IL-2}$  ( $30 \text{u} / \text{ml}$ )。直到第 14 天，每 3—4 天将 *ca. 50%* 的培养基用 *IL-2* ( $30 \text{u} / \text{ml}$ ) 交换。

当生长良好时，将培养物分装于几个 96 孔盘中。在以后的再刺激中，还可以将它们分布在较大的孔中。用上述方法每两周进行



一次新的再刺激。从第 3 次再刺激起,用增殖试验测定微培养物的特异性。

### 3. 与 SW—GAD 的增殖试验

所有试验在至少两份制备物中进行。

#### a) 刺激物细胞:

以 HLA II 型抗原相同的自体 *PBL<sub>s</sub>* 或血常供体的 *PBL<sub>s</sub>* 作为刺激物细胞。如 2 中所述, *PBL<sub>s</sub>* 与抗原一起预培养,用 4000 拉德照射,分布在 96 孔盘中(100000 细胞/孔)。

#### b) T 细胞

所用 T 细胞总来自再刺激阶段的最后一步。这些细胞用 DMEM 洗三次,除去抗原和 IL—2,然后分成 6000 个细胞/96 孔。如此分离的 T 细胞系 6/7 和 6/10,按照 Budapest 条约的规定,已在 DSM 保藏,保藏号为 DSM ACC2172 和 DSM ACC2173。

除与 SW—GAD 孵育外,对照孵育无 GAD。

37℃/7%CO<sub>2</sub> 下 3—4 天后,加入 1μCi <sup>3</sup>H—胸苷,再孵育 16—20 小时。然后用细胞收集仪将细胞转移到一玻璃纤维过滤器上,用 β 计数器测定掺入的放射活性。

表 1 表示与 SW—GAD 的增殖试验的典型结果。

表 1:

T 细胞系 6/7 和 6/10 与 SW—GAD 的增殖试验结果

细胞系	对照	cpm
-----	----	-----

	无抗原	SW—GAD
6/7	129	9373
6/10	117	5222

#### 4. 与衍生自 *H—GAD* 序列的肽的增殖试验

已通过至少 4 个再刺激循环而扩增,并在增殖试验中与 SW—*GAD* 反应的 *T* 细胞系,再与 *H—GAD* 的重叠肽进行试验。这些试验的目的是确定被 *T* 细胞识别的 *H—GAD* 的表位。为此,首先合成 *H—GAD* 的重叠的 20mer 肽(重叠区 10 个氨基酸,总共有 59 种不同的肽)。

每 4—5 个这种肽合并成一个库,并以终浓度 18 $\mu$ g/ml 加入到刺激物细胞中(刺激物细胞按 3a 部分所述方法制备)。这些刺激物细胞的进一步处理如 3a 部分所述。

然后,每个微培养孔中加入 6000—20000 个 *T* 细胞。以下步骤类似于 3b 部分所述。

图 3 和 4 表示 *T* 细胞系 6/7 和 6/10 用人 *GAD* 65kd 的肽库进行增殖试验的结果。两个 *T* 细胞系都与库 11 的肽旺盛增殖。与库 7 的增殖反应也被观察到,反应虽稍弱但却很明显。

图 5 和 6 表示 *T* 细胞系 6/7 和 6/10 与库 7 和 11 的 10 $\mu$ g/ml 单一肽的增殖试验结果。两个细胞系都与肽 5G1(相当于人 *GAD* 65 的氨基酸 266—285)有明显增殖,与肽 5F3(相当于人 *GAD* 65 的氨基酸 306—325)的增殖较差但也明显。

## 实施例 2

### 分离和测定抗原特异性 T 细胞亚群的方法

因为抗原特异性 T 淋巴细胞,特别是抗自身抗原的特异性 T 淋巴细胞在外周血液中的数量很小(预计频率为  $10^{-5}$ — $10^{-6}$ ),很明显,需要通过选择步骤首先浓缩在体内预活化的 T 细胞。这可通过两种方法达到:

#### 1. 与 IL-2 孵育扩增体内预活化 T 细胞

为此,用 *Ficoll* 密度梯度离心方法分离 *PBLs*,并调节使其在含 IL-2 的细胞培养基(*RPMI* 1640/5%人血清/30u/ml IL-2)中浓度为  $2 \times 10^6$  细胞/ml。将每等份 200 $\mu$ l 的细胞分配在几个 48 孔盘中,并培养 7 天。4 天后,再一次加入 IL-2。因为预活化 T 细胞表现高亲合力 IL-2 受体,在此刺激阶段,体内预活化 T 细胞选择性地繁殖,并在初级培养中积累。刺激阶段结束后,洗涤每个孔中的细胞,计数并用于增殖试验。

#### 2. 通过免疫磁分离浓缩体内预活化 T 细胞

为此,将 *Ficoll* 分离的 *PBLs* 与抗高亲合力 IL-2 受体的单克隆抗体一起孵育 ( $7 \times 10^6$  *PBLs*/ml; 10 $\mu$ l/ml 抗 IL-2 受体抗体 (*Boehringer Mannheim*); 30 分钟, 4℃。然后,细胞悬浮液用冰冷却的 *RPMI*/10%人血清(*HS*)(400g/10 分钟)洗涤两次,再将悬浮液调节至细胞密度为  $1-3 \times 10^7$ /ml。将偶联上绵羊抗一鼠抗体的 *Dynal* 公司的 *DynabeadsM-280* 加入此中 (*Dynabeads* 与靶细胞

的比例为 *ca.* 10—15)。将悬浮液 4℃ 下在摇床上非常缓慢地振荡。然后, 悬浮液用 *RPMI/10%HS* 稀释 10 倍, 并在事先预冷的磁颗粒浓缩器(*MPC*)中放置 1—2 分钟。带有 *IL-2* 受体的玫瑰花环 *T* 细胞被磁体固定后, 吸出上清液, 从 *MPC* 中去除孵育容器, 保留下来的细胞重新悬浮在 *RPMI/10%HS* 中。在 *MPC* 中再进行一次靶细胞的分离。再重复一次洗涤步骤。然后分离的细胞再悬浮在培养基中, 调节细胞数目为  $1 \times 10^7 / \text{ml}$ 。通过脱离(*detacher*)抗体用已知方法去除磁珠。

通过 2.1 或 2.2 的方法浓缩的预活化细胞然后被用于测试其抗自身抗原肽或抗肽/*MHC* 复合物的反应活性。

这有几种方法:

### 3. 用照射的刺激细胞和肽作为抗原的增殖试验

首先, 从 *Ficoll*—分离的 *PBLs* 制备自身刺激细胞。将刺激细胞在细胞培养基中的浓度调至  $10^6$  细胞/*ml*, 并与肽(终浓度  $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ )孵育 2 小时/ $37^\circ\text{C} / 7\% \text{CO}_2$ 。然后用 4000 拉德照射刺激细胞, 再份配在一 96 孔圆底培养板中, 细胞数为 100000 细胞/孔。

向每孔中加入用 2.1 或 2.2 方法所得体内预活化 *T* 细胞 100000 个, 并在  $37^\circ\text{C} / 7\% \text{CO}_2$  下孵育 4 天。然后该制备物体积的一半用 *IL-2* ( $30 \text{u} / \text{ml}$ ) 置换。再过 4 天后, 重复一次。

在微培养开始后第 12 天, 进行实际的繁殖试验。为此, 微培养物首先用 *DMEM* 洗两次, 以去除抗原和 *IL-2*。将每个培养物分成

4 等份,在 100000 照射的自体 *PBLs* 存在下双份孵育(37℃/7%  $\text{CO}_2$ )3 天,每例中分有肽或无肽的脉冲性刺激两种。然后加入 $^3\text{H}$ —胸苷,再过 16—20 小时后测定掺入的放射活性。

4. 用标记的寡聚肽/*HLA* 复合物直接检测自身反应性 *T* 细胞。

此处使用经 2.2 的方法浓缩的体内预活化 *T* 细胞。调节细胞在 *RPMI*/10%*HS* 中的浓度为  $10^6/\text{ml}$ ,并在 40℃下与带有荧光标记的寡聚的 *HLA*—肽复合物孵育 30 分钟。然后用冰冷的细胞培养基洗涤细胞两次。在流式细胞计中对荧光标记的细胞群进行分析。

### 实施例 3

提呈特定的自身反应性肽的 *MHC* 分子的鉴别

首先将肽按 *Bolton* 和 *Hunter* 的方法用 $^{125}\text{I}$  标记(*Bolton*, A. E. 和 *Hunter*, W, M., *Biochem. J.* 133(1993),529—531)。然后将 *MHC* 型待测的供体的  $2-5 \times 10^6$  *PBLs* 在 37℃下在含 $^{125}\text{I}$ —标记肽(2—10 $\mu\text{M}$ )的细胞培养基中孵育 4 个小时。细胞洗涤后,在由 0.5%*NP40*; 0.5%*Mega 9*; 150 $\text{mM}$  *NaCl*; 5 $\text{mM}$  *EDTA*; 50 $\text{mM}$  *Tris*  $\text{pH}7.5$ ; 2 $\text{mM}$  苯甲磺酰氟组成的溶解缓冲液中溶解。用连于蛋白 *A*—*Sepharose* 的构架(*framework*)特异性单克隆抗体(如针对 *HLA*—*DR* 的单克隆抗体 *L243* (*ATCC HB55*))从混合物中将 *MHC* 分子免疫沉淀,并用  $\gamma$  计数器测定结合在蛋白 *A*—*Sepharose* 上的放射活性。

### 实施例 4

能提呈自身反应性肽给 T 细胞系 6/7( *DSM ACC2172*) 和 6/10( *DSM ACC2173*) 的 *MHC* 分子亚型的测定

实验步骤类似于实施例 1.3。但不用自体 *PBLs* 作为抗原提呈细胞, 而用异源供体的 *PBLs*, 它与从自身中分离出 T 细胞系的供体的 *MHC* 分子不完全相应, 而只是所限定的 *MHC* 等位基因相应。用自身抗原性肽 5G1(相当于人 *GAD 65* 的氨基酸 266—285) 和 5F3(相当于人 *GAD 65* 的氨基酸 306—325) 进行增殖试验。

表 3 表示该试验的结果。在 *DR B1* 等位基因 0401 存在下, T 细胞系 6/7 和 6/10 与两种肽作用后都可以增殖。*DQ A1* 或 *DQ B1* 等位基因的变异对 T 细胞系的刺激反应性无影响。T 细胞系 6/7 识别肽 5G1 还与等位基因 *B1 0101* 或/和 1601 有关。

表 3 用肽 5G1 和 5F3 刺激后用具有各种单型的 PBLs 作为抗原提呈细胞的 T 细胞增殖

供体	APC 的单型 DR B1* DQ A1* DQ B1*		等位基因与 TCL 供体 等位基因的等同性	TCL 6/7 cpm + 肽 SI		TCL 6/10 cpm + 肽 SI	
A.K.	0301	0501	0201	DR: 2 个等位基因等同	5G1	55.0	6.0
	0401	0301	0302	DQ: 4 个等位基因等同	5F3	3.8	3.8
G.H.	0301	0501	0201	DR: 1 个等位基因等同	5G1	0.9	1.5
	0404	0301	0302	DQ: 4 个等位基因不同	5F3	0.6	1.5
G.E.	1302	0102	0604	DR: 1 个等位基因等同	5G1	67.8	22.6
	0401	0301	0302	DQ: 2 个等位基因不同	5F3	7.0	6.5
19	0301	0501	0301	DR: 2 个等位基因等同	5G1	45.7	8.5
	0401	0201	0301	DQ: 1 个等位基因等同	5F3	3.1	2.8
D.J.	0101	0101	0501	DR: 2 个等位基因不同	5G1	28.6	2.2
	1601	0102	0502	DQ: 4 个等位基因不同	5F3	1.2	1.4

TCL = T 细胞系

APC = 抗原提呈细胞

SI = 刺激指数; 有肽存在时的 cpm 被无肽时的 cpm 除。

## 实施例 5

### 使用 T 细胞系 6/10 测定肽 5G1 的变异体的增殖试验

为了阐明刺激肽 5G1 的核心结构,使用 T 细胞系 6/10 来测定此肽的各种变异体的刺激增殖试验(见表 4)。

对第一系列 20mer 变异体的试验,目的在于确定是否 5G1 结构上 C—或 N—末端的边缘氨基酸在被 T 细胞系 6/10 的识别中起作用。刺激指数表明向 C—末端移动 20mer 肽不增加增殖活性。向 N—末端移动 6 个氨基酸引起刺激能力减低。

用第二系列肽变异体所作的试验,目的是检查 C—末端缩短后对其刺激能力的影响。该系列实验表明 C—末端的氨基酸残基组氨酸(H)和苯丙氨酸(F)对刺激能力有重要影响。

用第三系列肽变异体的试验,目的是确定最小刺激活性肽的 N—末端。如果从 18mer 去掉亮氨酸(L)和脯氨酸(P)而 C—末端不变,这引起刺激指数大大下降。因此 N—末端确定为 L 和 P。如果因去掉 H 和 F 而进一步缩短 C—末端,也导致刺激活性下降。因此,对 T 细胞系 6/10,可产生刺激作用的最小肽为序列 LPRLIAFTSEHSHF 的 14mer。

#### 表 4

为了鉴定具有刺激活性的最小肽结构, TCL6/10 与肽 5G1 的变异体的反应。



## 5G1 的肽变异体

## 刺激指数

---

5G1	GMAALPRLIAFTSEHSHFSL	5.4
	ALPRLIAFTSEHSHFSLKKG	3.0
	RLIAFTSEHSHFSLKKGAAA	3.2
	PEVKEKGMAALPRLIAFTSE	0.6
	AALPRLIAFTSEHSHFSL	4.5
	AALPRLIAFTSEHSHF	2.9
	AALPRLIAFTSEHS	0.7
	AALPRLIAFTSE	0.6
	GMAALPRLIAFTSE	0.8
	GMAALPRLIAFT	1.0
	LPRLIAFTSEHSHFSLKK	3.2
	RLIAFTSEHSHFSL	1.4
	LPRLIAFTSEHSHF	4.6
	LPRLIAFTSEHS	0.4

图 1

I-L-I-K-C-D-E-R-G-K-M-I-P-S

L-G-I-G-T-D-S-V-I-L-I-K-C-D

L-A-F-L-Q-D-V-M-N-I-L-L-Q-Y

Y-D-L-S-Y-D-T-G-D-K-A-L-Q-C

图 2

V-S-Y-Q-P-L-G-D-K-V-N-F-F-R  
L-A-A-D-W-L-T-S-T-A-N-T-N-M  
L-L-Y-G-D-A-E-K-P-A-E-S-G-G  
V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A  
L-L-Q-Y-V-V-K-S-F-D-R-S-T-K  
F-T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y  
L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R-E-I-I-G  
N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P  
K-I-W-M-H-V-D-A-A-W-G-G-G-L  
W-G-G-G-L-L-M-S-R-K-H-K-W-K  
E-G-Y-E-M-V-F-D-G-K-P-Q-H-T  
R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G  
W-L-T-S-T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E  
T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E-I-A-P-V  
L-V-S-A-T-A-G-T-T-V-Y-G-A-F  
Y-I-P-P-S-L-R-T-L-E-D-N-E-E  
V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F

图 3

T 细胞系 6/7 与肽的增殖试验

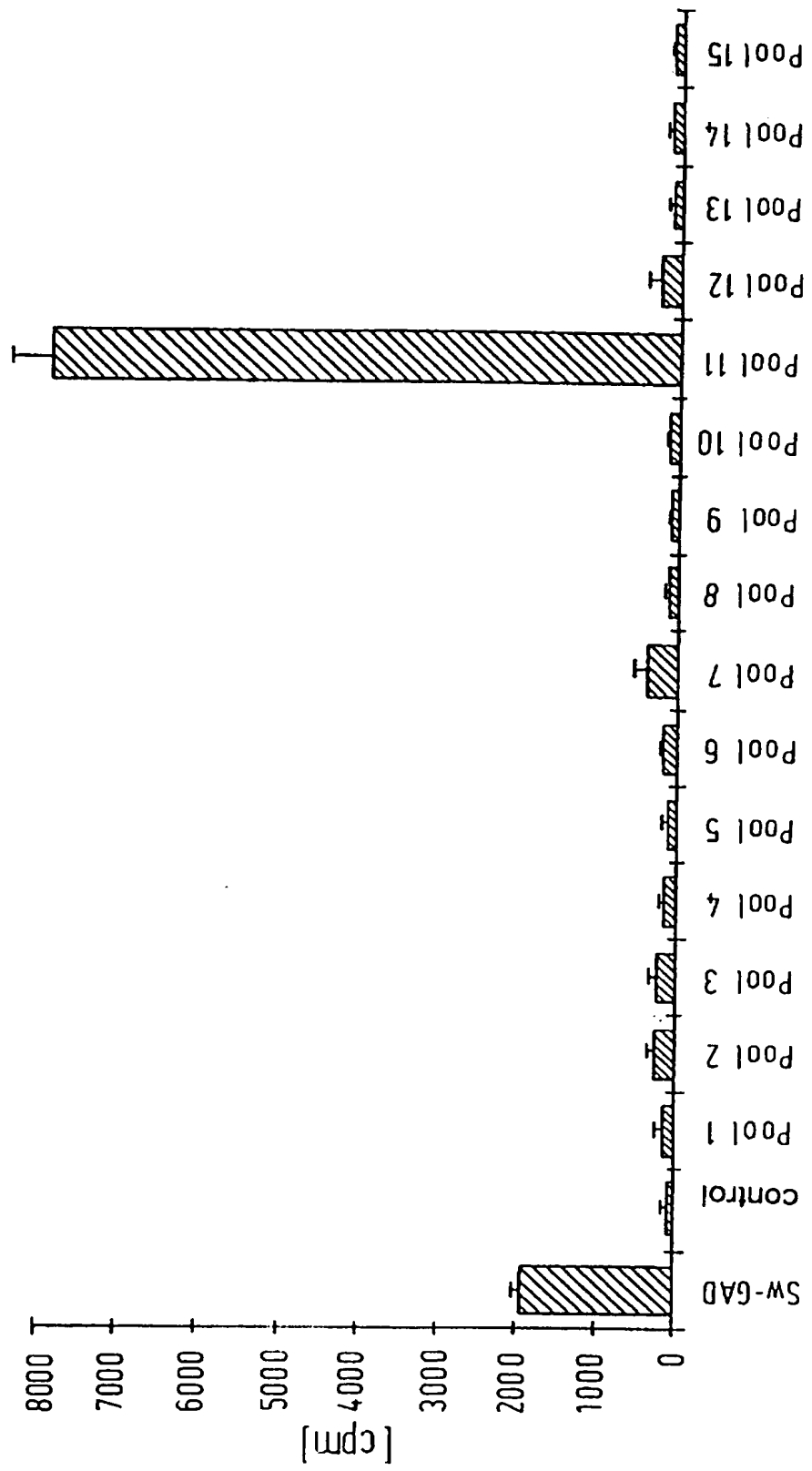


图 4

T 细胞系 6/10 与肽的增殖试验

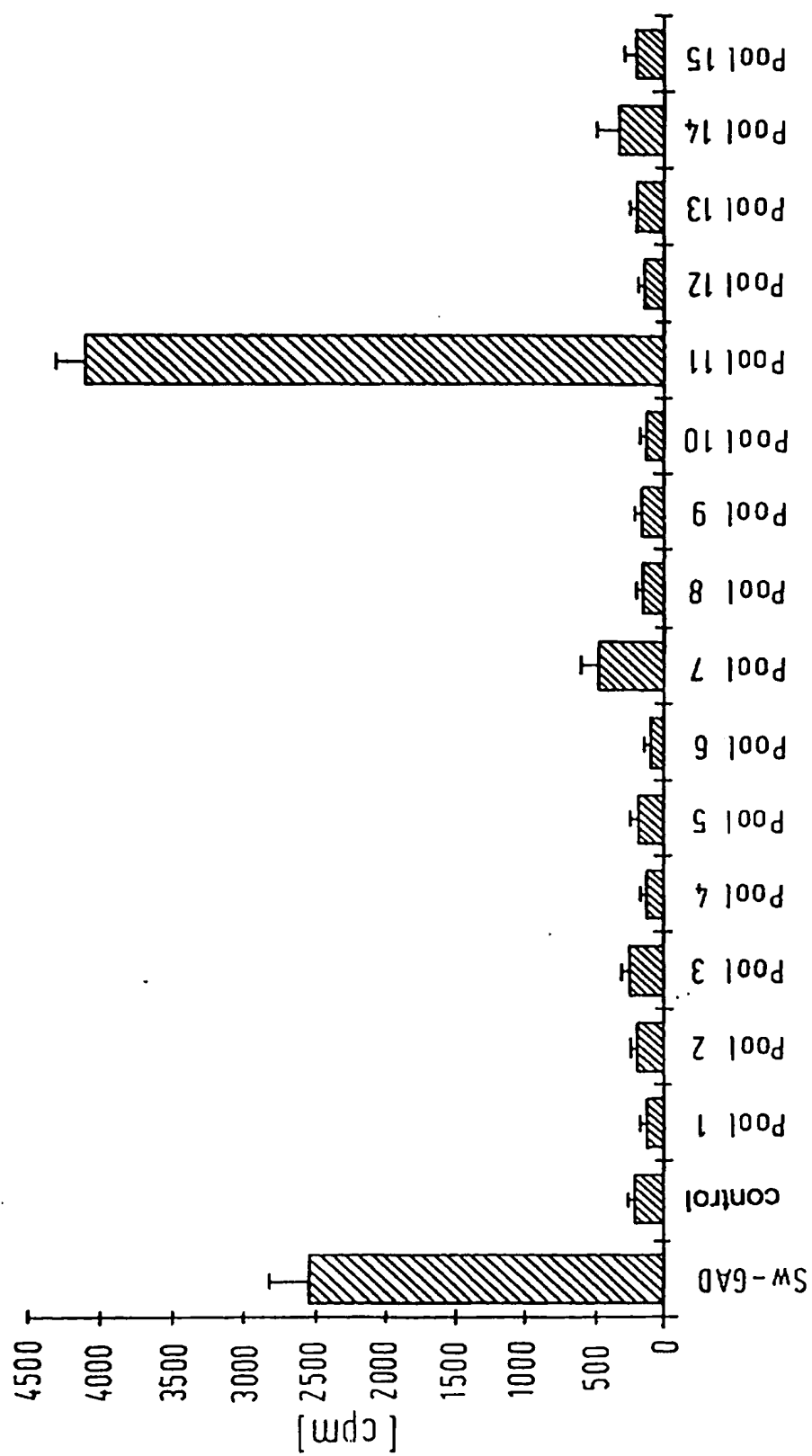


图 5

T 细胞系 6/7 与库 7 和 11 的单一肽的增殖试验

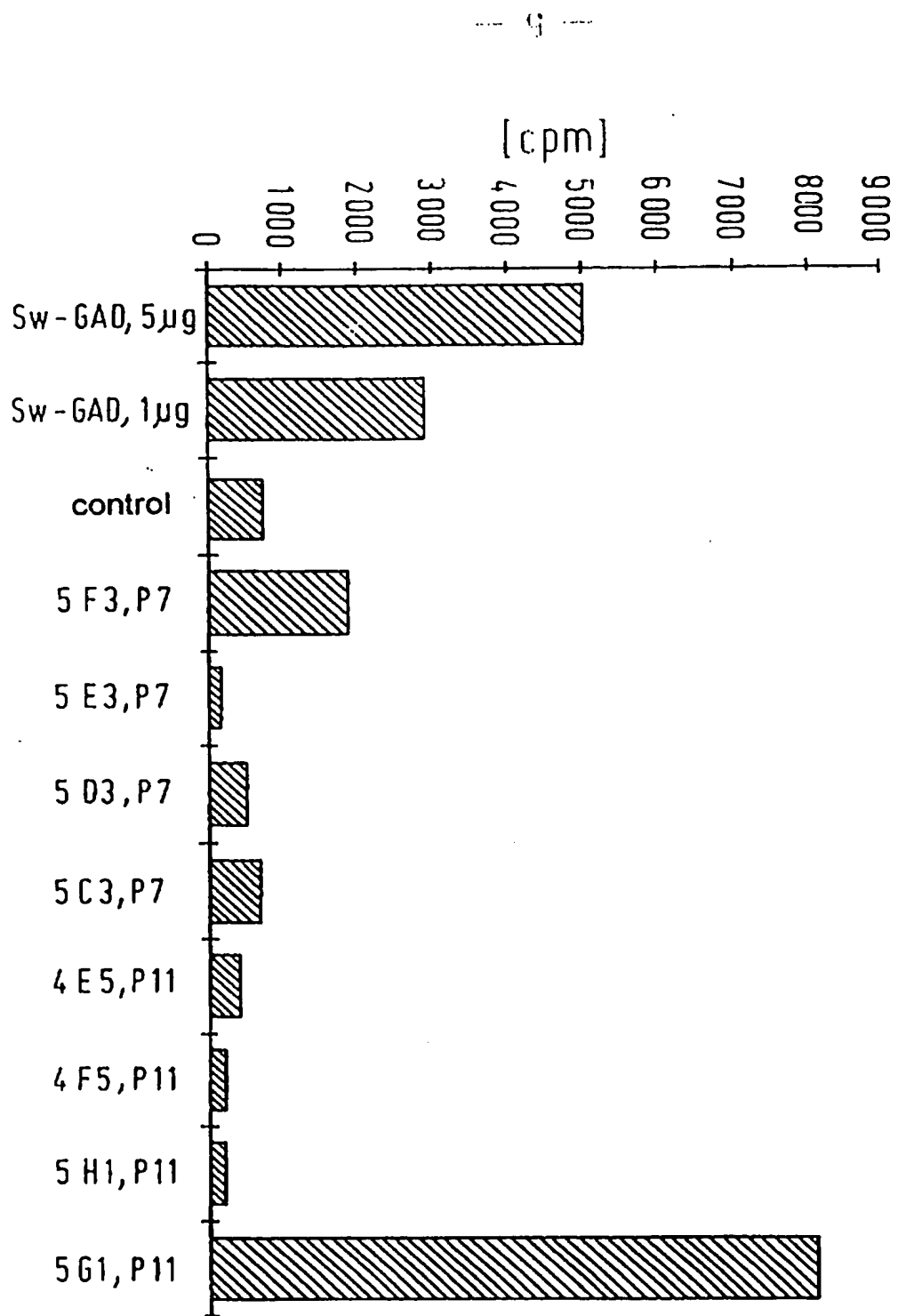


图 6

T 细胞系 6/10 与库 7 和 11 的单一肽的增殖试验

